

นิพนธ์ต้นฉบับ

การปรากฏของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยา P-glycoprotein (P-gp) เป็นคุณสมบัติของพลาสมาเซลล์ ในกลุ่มคนไข้ที่เป็น Plasma Cell Dysclasia หรือไม่

วิเชียร มงคลศรีตระกูล, Terry Kimlinger*, Greg Ahmann* และ Philip Greipp*

หน่วยโลหิตวิทยา กองอายุรกรรม รพ.พระมงกุฎเกล้า, *Department of Laboratory Medicine, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA

บทคัดย่อ : โรค multiple myeloma เป็นที่ยอมรับกันว่าไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ โรคจะกลับเป็นใหม่หลังจากที่เข้าสู่ระยะคงที่ (plateau phase) ในคนไข้ส่วนใหญ่ การดื้อยาของเซลล์มะเร็งเป็นปัญหาใหญ่ที่พบ ผู้วิจัยได้ศึกษา drug resistance marker, P-glycoprotein (P-gp) ในกลุ่มคนไข้ที่เป็นโรค plasma cell dysclasia ซึ่งประกอบด้วยคนไข้ monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) 8 ราย plasmacytoma (PCM) 5 ราย multiple myeloma 19 ราย (MM; 6 รายได้รับการวินิจฉัยครั้งแรก, 7 รายอยู่ในระยะคงที่, 5 รายดื้อต่อยาเคมีบำบัด และ 1 รายโรคกลับเป็นใหม่) และ amyloidosis 11 ราย (7 รายได้รับการวินิจฉัยครั้งแรก, 4 รายระหว่างได้รับยาเคมีบำบัด) โดยใช้เทคนิคของ 3-color flow cytometry, แยก plasma cell โดยใช้การย้อม CD38+/45-(dim) ด้วย monoclonal antibodies ต่อ P-gp 2 ชนิด (MRK16 และ UIC2) พบว่ามีการปรากฏของ P-gp บน plasma cells ในไขกระดูก 42/43 ราย โดยมี resistance index (RI) ระหว่าง 2.0-7.07 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเซลล์ KG-1A (positive control) ที่มี RI อยู่ระหว่าง 3.05-3.08, ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า การดื้อยาโดยผ่านทางขบวนการของ P-gp เป็นคุณสมบัติของ plasma cell และอาจจะเป็นเหตุผลหนึ่งในการอธิบายว่าทำไมโรคกลุ่มนี้จึงมีการกลับเป็นใหม่อีกอยู่เสมอ ดังนั้นการเฝ้าติดตามการดื้อยาที่ผ่านขบวนการนี้จะเริ่มนำมาใช้ตั้งแต่ระยะแรกๆ ของโรค

Key Words : ● P-glycoprotein ● Multidrug resistance (MDR) ● Monoclonal gammopathy
● Multiple myeloma ● Amyloidosis

วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต 2542;9:29-38.

Monoclonal gammopathies ซึ่งเกิดใน plasma cell dysclasia นั้นเป็นกลุ่มอาการของโรคที่มีการดำเนิน

โรคอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ระยะเริ่มแรกที่ไม่มีอาการใดๆ ที่เรียกว่า asymptomatic monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) จนกระทั่งเกิดเป็นโรค multiple myeloma (MM) และ amyloidosis คำถามที่เกิดขึ้นเสมอคือ ทำไมเราไม่สามารถที่จะรักษาโรคนี้ให้หายขาดได้หรือทำให้อัตรา complete re-

ได้รับต้นฉบับเมื่อ 4 สิงหาคม 2541 และให้ตีพิมพ์เมื่อ 30 สิงหาคม 2541
ต้องการสำเนาต้นฉบับติดต่อ นพ.วิเชียร มงคลศรีตระกูล หน่วยโลหิตวิทยา
กองอายุรกรรม โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า 315 ถนนราชวิถี เขตราชเทวี
กทม. 10400

mission สูงขึ้น ปรากฏการณ์การดื้อยาอาจเป็นคำตอบ, marker ที่สำคัญตัวหนึ่งที่ใช้บ่งบอกการดื้อยาของเซลล์มะเร็งคือ การปรากฏของ MDR-1 (multidrug resistance-1) เพื่อศึกษาคำถามนี้ผู้วิจัยจึงศึกษา P-gp expression บน plasma cells ในคนไข้กุ่มนี้

P-gp เป็น transmembrane glycoprotein ทำหน้าที่เหมือนปั๊มที่จะขับยาซึ่งมีการสะสมภายในเซลล์มะเร็งออกไปภายนอก¹ การปรากฏของ P-gp ใน lymphocytes ของคนปกติจะน้อยกว่า 1%² การที่มีระดับสูงกว่าปกติ พบได้ในเซลล์ที่ดื้อยาบางชนิด เช่น anthracycline, vinca alkaloid, epipodophyllotoxin, mitomycin, mitoxantrone และ paclitaxel^{3,4}

แนวทางการรักษาในปัจจุบัน คือ พยายามที่จะเอาชนะการดื้อยาของเซลล์ในระยะท้ายๆ ของโรค ข้อมูลวิจัยบางชิ้นพบว่า มี P-gp ปรากฏในระดับต่ำในคนไข้ MM ระยะแรก^{5,6} และเพิ่มขึ้นภายหลังจากการได้รับเคมีบำบัด⁵ ในขณะที่งานวิจัยบางชิ้นพบ P-gp ปรากฏในระดับสูงในคนไข้ MM ที่ยังไม่ได้รับการรักษาใดๆ มาก่อน⁷ บางการวิจัยพบ P-gp ปรากฏในคนไข้ MGUS⁸ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาค้นคว้า MGUS, plasmacytoma (PCM), MM (แรกวินิจฉัย, อาการคงที่หลังรักษา, ดื้อต่อการรักษา, กลุ่มที่กลับเป็นใหม่) และคนไข้ amyloidosis (แรกวินิจฉัย และหลังจากได้รับการรักษา) จุดมุ่งหมายเพื่อต้องการแสดงให้เห็นว่าการปรากฏของ P-gp เป็นคุณสมบัติภายในของ plasma cells ในคนไข้ MGUS, PCM, MM และ amyloidosis หรือไม่

วัสดุและวิธีการ

ตัวอย่าง

เก็บเซลล์จากไขกระดูกโดยได้รับอนุญาตจากผู้ป่วยเป็นลายลักษณ์อักษร ผู้ป่วยที่มี dysproteinemia ทั้งหมด 43 คน เป็น MGUS 8 คน PCM 5 คน MM แรกวินิจฉัย 6 คน MM ใน plateau phase 7 คน MM ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด 5 คน MM ที่กลับเป็นใหม่

1 ราย amyloidosis ที่ไม่ได้รับเคมีบำบัด 7 ราย amyloidosis ที่ต้องการรักษา 3 ราย และ amyloidosis ที่โรคสงบหลังได้รับเคมีบำบัด 1 ราย

นิยามของ plateau phase ใน MM คือ มีระดับของ M-protein และ plasma ไม่เพิ่มขึ้นเกินกว่า 25% และไม่มีอาการอื่นๆ ร่วมด้วย (bone pain, hyperviscosity syndrome, hypercalcemia, renal failure, plasmacytoma) นิยามของโรคที่ดื้อยาเคมีบำบัด คือ มีระดับของ M-protein หรือ plasma cells เพิ่มขึ้นมากกว่า 25% ระหว่างที่ได้รับยา หรือเกิดอาการอื่นๆ ร่วมด้วย นิยามของกลุ่มที่โรคกลับเป็นใหม่ คือ มีการเพิ่มขึ้น M-protein หรือ plasma cells มากกว่า 25% หรือมีอาการอื่นๆ ร่วมด้วยภายหลังจากที่โรคอยู่ในระยะ plateau phase

นิยามของ amyloidosis ที่อยู่ในระยะคงที่ คือ มีระดับของ M-protein หรือ plasma cells เพิ่มขึ้นไม่มากกว่า 25% และไม่มีอาการอื่นๆ ร่วมด้วย (heart failure, renal failure, neuropathy, gastrointestinal tract involvement) นิยามของกลุ่มที่ดื้อต่อยา คือ มีระดับของ M-protein หรือ plasma cells มากกว่า 25% หรือเกิดอาการอื่นๆ ร่วมด้วยระหว่างได้รับยาเคมีบำบัด

ตัวควบคุม (Controls)

เซลล์ KG-1A เป็น positive control เป็น human leukemic cell line ซึ่งมี MDR expression โดยเลี้ยงใน RPMI 1640 (BioWhittaker; Walkersville, MD) และ 10% FCS, 4 mM glutamine, 100 U/mL Penicillin, 0.1 mg/mL Streptomycin โดยเซลล์จะถูก subcultured ใน medium ใหม่ 3 ครั้งต่ออาทิตย์ สำหรับ negative control ใช้ KG-1A cell line หรือเซลล์มะเร็งของคนไข้ที่ไม่ใช่ non-specific, isotype matched immunoglobulin แทน specific monoclonal antibody ต่อ P-gp

การเตรียมเซลล์ (Cell preparation)

แยก mononuclear cells จากไขกระดูกโดยใช้ Ficoll gradient จากนั้นเซลล์จะถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (cryopreserved) ใน freezing media ที่ประกอบด้วย 10% DMSO ใน RPMI (10% DMSO, 50% FCS, 40% RPMI, 4 mM glutamine, 100 U/mL penicillin และ 0.1 mg/mL Streptomycin

เซลล์จะถูก thawed และล้างด้วย PBS/1% BSA จากนั้น aliquots เซลล์ประมาณ 1 ล้านเซลล์ incubated 3-10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เซลล์จะถูก permeabilize ด้วย FACS[®] brand lysing solution (Becton Dickinson; San Jose, CA) 1:10 ปริมาตร 2 mL ก่อนที่จะย้อมด้วย UIC2 monoclonal antibody (MoAb) จากนั้นล้างด้วย PBS

สำหรับการย้อมด้วย MRK16 antibody เซลล์จะถูก thawed และล้างโดยไม่ใช้ lysing solution

การย้อมติดสลากระหว่าง P-gp (MRK16, UIC2) และ CD38, CD45 MoAb

ผู้วิจัยใช้ CD38-PE และ CD45-PerCp MoAb (Becton Dickinson: San Jose, CA) ในการบ่งชี้ plasma cells ซึ่ง MoAb ดังกล่าวจะจับกับ surface antigens ที่อยู่บนเซลล์ (plasma cells จะมี CD38+/CD45- หรือ 45 dim)

การเตรียมเซลล์ของคนที่ทำโดย incubated ใน 10% human AB serum ที่ 37 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นใส่ primary MoAb (MRK16, UIC2) (ตารางที่ 1) 100 mL ลงในแต่ละ tube และ incubated นาน 30 นาทีที่ 4 °C MoAb ที่ไม่ได้จับกับ antigen จะถูกล้างออก 3 ครั้งด้วย PBS/1% BSA 2 mL, ใส่ secondary antibody [FITC conjugated F(ab') fragment of goat anti mouse immunoglobulin: Sigma Bioscience; St Louis, MO] incubate 20 นาทีแล้วล้างออก fixed ด้วย 0.5 mL 1% paraformaldehyde 10 นาที จากนั้นล้างอีกครั้ง ใส่ CD38-PE และ CD45-

PerCp10 mL ลงในแต่ละ tube, incubated 25 นาทีที่ 4 °C หลังจากล้าง 1 ครั้งเซลล์จะถูก resuspended ใน 0.5 mL 1% paraformaldehyde และ analyzed ด้วยโปรแกรม CellQuest โดยเครื่อง BD FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA)

ตารางที่ 1 Monoclonal antibodies for drug resistance makers used in this study

Clone	P-gp MoAb	
	MRK16	UIC2
Isotype	IgG2a	IgG2a
Specificity	extracellular epitope	extracellular epitope
Vendor	Kamiya Tukwila, WA	Immunotech Westbrook, ME
Lot No	001AL	02
Concentration	150 µg in 300 µL	2mg/mL
Dilution	1:50	1:10

การแปลผล

ผู้วิจัยได้กำหนดค่า resistance index (RI) เพื่อเปรียบเทียบการปรากฏของ drug resistance markers ระหว่างเซลล์ของคนไข้และ controls โดยค่า RI เป็นสัดส่วนของ geometric mean ระหว่างเซลล์คนไข้ [เซลล์คนไข้ + specific antibody (MRK16 หรือ UIC2 MoAb) + CD38+ และ CD45-/dim gate] และ control [เซลล์คนไข้ + non specific IgG + (CD38+ และ CD45-/dim gate)] ค่าที่ได้จะถูกประเมินว่าเป็นบวกเมื่อ RI มากกว่าหรือเท่ากับ 2.0 โดยใช้ค่าดังกล่าวเราสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของ fluorescent intensity ของ P-gp expression ได้จากกราฟอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับ control

ผลลัพธ์

ค่า resistance index (RI) โดย MRK16 และ UIC2 MoAb ในคนไข้ MGUS เป็น 1.08-2.18 และ 2.0-5.67 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) มีเพียงคนไข้ 1/8 รายที่ให้ค่าเป็นบวกเมื่อใช้ MRK16 และ 8/8 รายให้ค่าเป็นบวกเมื่อใช้ UIC2

ตารางที่ 2 P-gp expression using MRK16 and UIC2 MoAb in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS)

Pt. No.	Age	Sex	Type	%PC*	MRK16 RI*	UIC2 RI
1	69	M	GL	10	1.38	2
2	49	F	GL	5	2.18	2.03
3	45	M	GK	6	1.08	2
4	48	F	GK	12.2	1.2	4.42
5	67	F	GK	6.3	1.38	4.67
6	49	M	AL	2	1.25	5.67
7	61	M	GK	4	1.43	5.12
8	36	M	GK	14.3	1.11	4.83

* %plasma cells in bone marrow (mononuclear cells preparation)

* resistance index

ค่า RI เมื่อใช้ MRK16 และ UIC2 MoAb ในคนไข้ plasmacytoma เป็น 1.08-1.8 และ 3.15-5.46 (ตารางที่ 3) ไม่มีคนไข้รายใดให้ค่าบวกเมื่อใช้ MRK16 แต่ทุกรายให้ค่าบวกเมื่อใช้ UIC2 MoAb

ค่า RI ในคนไข้ multiple myeloma เป็น 0.86-2.77 และ 1.08-7.07 เมื่อใช้ MRK16 และ UIC2 MoAb ตามลำดับ มีคนไข้เพียง 1/19 รายให้ค่าบวกเมื่อใช้ MRK16 MoAb (RI = 2.77) และมีเพียง 1/19 รายให้ค่าเป็นลบ เมื่อใช้ UIC2 MoAb (RI = 1.08) (ตารางที่ 4)

ค่า RI ในคนไข้ amyloidosis เมื่อใช้ MRK16 MoAb เท่ากับ 1.4-2.63 มีคนไข้ 3 รายที่ให้ค่าเป็นบวก โดย RI เท่ากับ 2.22, 2.45, และ 2.63 คนไข้ทุกรายให้ค่าเป็นบวกเมื่อใช้ UIC2 MoAb (RI = 2.05-7.2) (ตารางที่ 5)

ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างค่า RI กับเปอร์เซ็นต์ของ plasma cells ในคนไข้ทุกกลุ่ม

ค่า RI ใน positive control cell line (KG-1A) ซึ่งควบคุมกับเซลล์คนไข้ เท่ากับ 1.57-1.60 เมื่อใช้ MRK16 MoAb และเท่ากับ 3.05-3.08 เมื่อใช้ UIC2 MoAb

ค่า RI ของ myelocyte/metamyelocyte เท่ากับ 1.24-1.6 เมื่อใช้ MRK16 MoAb และเท่ากับ 1.32-1.65

ตารางที่ 3 P-gp expression using MRK16 and UIC2 MoAb in plasmacytoma

Pt. No.	Diagnosis	Age	Sex	Type	%PC*	MRK16 RI*	UIC2 RI
1	PCM♥-sacrum	50	M	K	12	1.8	3.33
2	PCM-fibula+groin	64	M	AL	4.6	1.78	5.46
3	PCM-testis	55	M	GK	0.8	1.38	4.56
4	PCM	40	M	neg	14.5	1.08	3.15
5	PCM	79	M	GK, ML	3.3	1.68	3.53

* %plasma cells in bone marrow (mononuclear cells preparation)

* resistance index

♥ plasmacytoma

ตารางที่ 4 P-gp expression using MRK16 and UIC2 MoAb in multiple myeloma

Pt. No.	Age	Sex	Type	Condition	%PC	MRK16 RI	UIC2 RI
Pre-treatment group							
1	76	M	K	idio BJPuria*->MM, no Tx	75	1.29	2.00
2	77	M	AL	1st Dx, no Tx	25	1.47	2.07
3	75	F	K	MM, non secretory, no Tx	33	1.33	4.31
4	35	M	GK	SMM, no Tx	16	1.29	5.40
5	70	F	GL	MGUS->MM, no Tx	30	1.28	7.07
6	48	F	GK	MGUS->SMM no Tx	14	1.22	5.64
Stable disease							
7	60	M	GK	still on MP* since 8/95 stable	5	1.50	2.50
8	44	M	K	VBMCP♦ 6/94-6/96, IFN 7/96 stable	11	2.77	2.04
9	59	F	K	on Tx VBMCP	16	0.86	4.00
10	61	M	GK	stable on MP 92-93, 1/96-8/96	8	1.07	4.36
11	52	F	GK	VADπ x7, stable	10	1.19	2.36
12	44	M	GK	on Tx CD♥ stable	9	1.18	2.59
13	63	F	K	MM (non secretory) on MP 91-93	5	1.15	4.88
Refractory group							
14	71	M	GK	MPx3 periods, 4/90-10/96	45	1.10	5.40
15	69	M	K	MP 6/95-8/96 refractory->VBAP▲10/96	17	1.33	1.08
16	64	F	GK	refractory to MP and fludarabine+CTX	30	1.29	2.38
17	42	M	K	VAD from 4/96 till now (9/96)	65	0.95	6.36
18	71	M	GK	refractory to MP	63	1.25	4.21
Relapse group							
19	80	M	GK	relapse	50	1.44	2.44

* idiopathic Bence Jones proteinuria, * melphalan+prednisone, ♦ vinblastine+bleomycin+melphalan +cyclophosphamide (CTX)+ prednisone, π vincristine+adriamycin+dexamethasone, ♥ cyclophosphamide +dexamethasone, ▲ vincristine+bleomycin+adriamycin+prednisone

เมื่อใช้ UIC2 MoAb ซึ่งใช้เป็น internal negative control ค่า RI ของเซลล์ lymphocytes เท่ากับ 1.54-2.04 เมื่อใช้ MRK16 MoAb และเท่ากับ 2.4-5.19 เมื่อใช้ UIC2 MoAb ในคนไข้จำนวน 5 รายผู้วิจัยได้เปรียบเทียบระหว่างการใช้ fresh specimen และ cryopreserved cells พบว่าคนไข้ทุกรายที่ให้ค่าบวกเมื่อใช้

fresh sample จะให้ค่าบวกเมื่อใช้ cryopreserved cells ในตัวอย่างที่เก็บพร้อมกัน ไม่มีคนไข้รายใดที่ให้ค่าลบเมื่อใช้ fresh sample กลับให้ค่าบวกเมื่อใช้ cryopreserved cells และไม่มีคนไข้รายใดที่ให้ค่าบวกเมื่อใช้ fresh sample กลับให้ค่าบวกเมื่อใช้ cryopreserved cells

ตารางที่ 5 P-gp expression using MRK16 and UIC2 MoAb in amyloidosis

Pt. No.	Age	Sex	Type	Condition	%PC	MRK16 RI	UIC2 RI
Pre-treatment							
1	47	F	L	no Tx	13	1.89	2.05
2	77	M	L	1st Dx no Tx yet	6	2.22	2.38
3	47	F	GL	1st Dx noTx yet	9	1.56	2.60
4	68	M	GL	1st Dx no Tx yet	1	1.40	2.40
5	74	M	L	1st Dx MP x1 course	15	1.60	2.13
6	61	M	L	Dx 8 mo ago, no Tx, slow progress	8	2.45	7.20
7	71	F	GL	1st Dx, no Tx yet	11	1.80	6.39
Stable disease							
8	49	F	L	stable after VBMCPx2->HDdexa* till now	1	1.67	5.22
Refractory group							
9	54	F	L	MP1/96 til now, progress	6	1.63	3.82
10	57	M	L	MP x7 no response	5	1.67	3.00
11	48	F	L	MP x6 till now, progress	1	2.63	5.56

* high dose dexamethasone

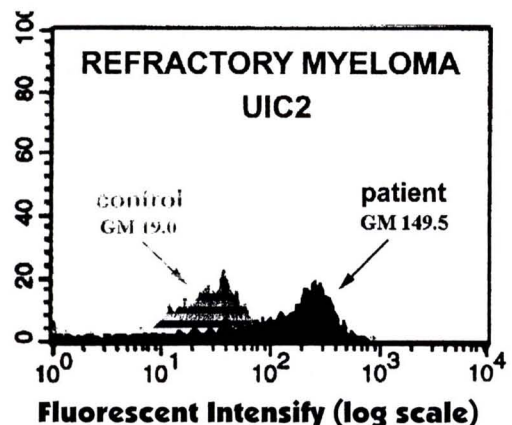
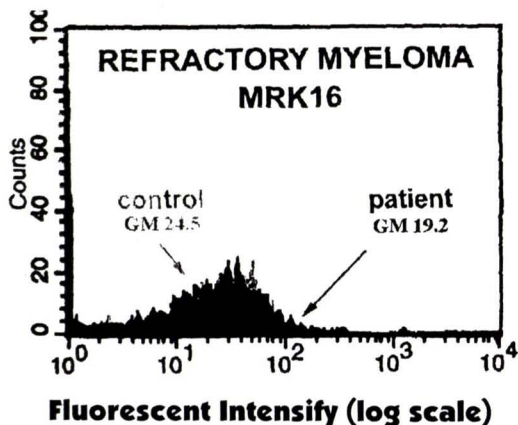
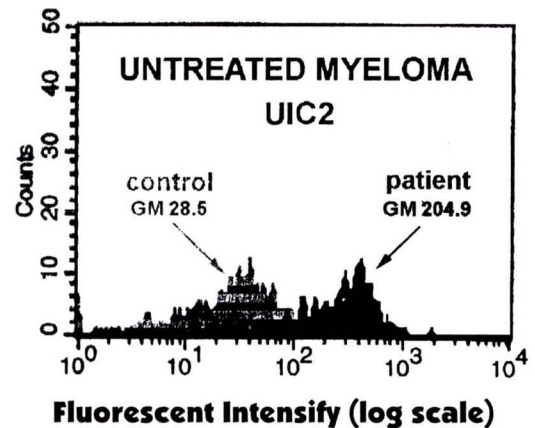
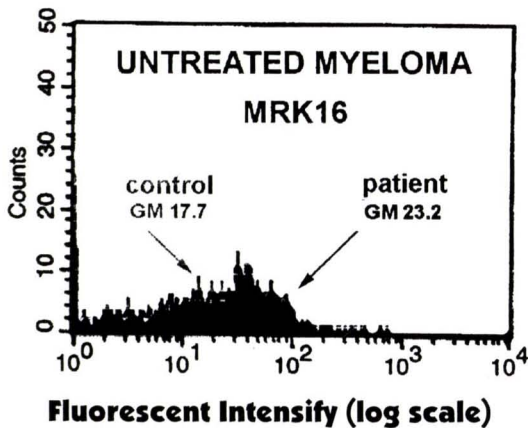
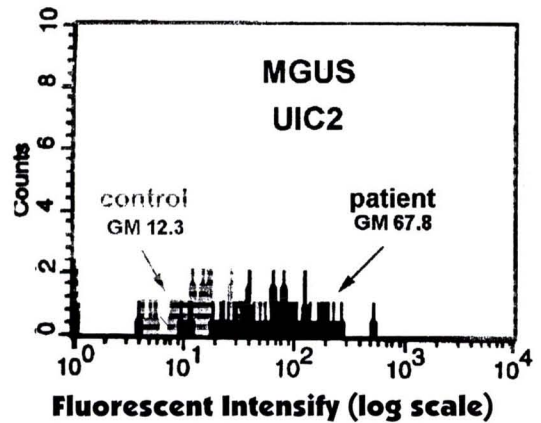
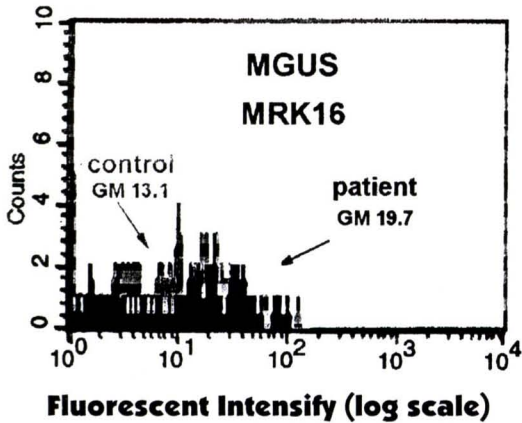
วิจารณ์

แม้ว่าการใช้เคมีบำบัดสามารถลดปริมาณ plasma cells, ลดระดับ monoclonal Ig และลดอาการต่างๆ ได้ เช่น การปวดกระดูก อย่างไรก็ตามมีคนไข้ร้อยละน้อยรายที่สามารถเข้าสู่ complete response ได้, induction therapy โดยใช้ standard regimen สามารถจะทำให้เกิด objective response ได้เพียง 40-50% ในคนไข้ MM ที่ยังไม่เคยได้รับการรักษามาก่อน^{9,10} คนไข้ที่สามารถอยู่ใน remission ได้เป็นเวลา 5 ปีนับจากเริ่มรักษาพบเพียง 20% และอย่างน้อย 30% ของคนไข้ MM ตอบสนองต่อการรักษาได้ไม่เป็นที่พอใจตั้งแต่ induction chemotherapy^{11,12} และโดยทั่วไปคนไข้จะเสียชีวิตโดยมีอัตราการเฉลี่ยประมาณ 3 ปีนับจากได้รับการวินิจฉัย¹³⁻¹⁶ แม้ว่าคนไข้ส่วนใหญ่จะตอบสนองต่อการรักษาในช่วงแรก แต่มักจะมีปัญหากลับเป็นใหม่และต้องต่อยาเคมีบำบัดในเวลาต่อมา ผู้วิจัยได้ทำการศึกษา P-gp โดยใช้ MoAb 2 ชนิดที่มีขายในท้องตลาดเพื่อเป็น

ตัวบ่งชี้ถึง MDR-1 expression ในคนไข้ MGUS, PCM, MM และ amyloidosis ระยะต่างๆ เพื่อดูว่าสามารถจะอธิบายคุณลักษณะการดื้อยาของ plasma cells ในคนไข้ monoclonal gammopathy ได้หรือไม่? ผู้วิจัยใช้ MRK16 และ UIC2 MoAb เพื่อหาปริมาณของ P-gp พบว่าเมื่อใช้ MRK16 MoAb จะให้ผลบวกในคนไข้เพียง 5 ใน 43 ราย แต่คนไข้เกือบทุกราย (42/43) ให้ผลบวกเมื่อใช้ UIC2 MoAb, ในกลุ่ม UIC2 MoAb เซลล์จะถูก fixed ด้วย FACS® brand lysing solution มีรายงานว่า UIC2 MoAb สามารถใช้ตรวจหา surface epitope ของ P-gp ได้^{17,18} และมีรายงานการใช้ neuraminidase เป็น fixative reagent ว่าสามารถ enhance surface P-gp antigen ได้¹⁹⁻²¹ จากการศึกษาของผู้วิจัยในอดีตพบว่าการใช้ FACS® brand lysing solution สามารถเพิ่มการตรวจพบ P-gp ได้เมื่อใช้ UIC2 MoAb และ MRK16 MoAb²² ในการวิจัยครั้งนี้เนื่องจากการย้อมโดย MRK16 MoAb ได้ผลค่อนข้าง

อ่อน ผู้วิจัยจึงใช้ข้อมูลที่ได้จากการใช้ UIC2 MoAb ในการแปลผล, ค่า RI ของ P-gp ในคนไข้ plateau phase MM ทุกคนมีค่าน้อยกว่า 5 (2.04-4.88) แต่ในคนไข้

refractory MM 2/5 รายมีค่าสูงกว่า 5 (5.4, 6.36) (รูปที่ 1) ข้อมูลนี้เป็นเครื่องยืนยันว่าการเพิ่ม P-gp อาจจะเป็นขบวนการดื้อยาอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นระหว่างที่คนไข้



รูปที่ 1 Show P-gp expression using MRK16 and UIC2 MoAb detected by flow cytometry in MGUS, untreated myeloma, refractory myeloma, refractory myeloma. (GM = geometric mean)

ได้รับยาเคมีบำบัด, อนึ่งแม้ว่า plasma cells ในไขกระดูกจะปรากฏ P-gp บนผิวของเซลล์ก็ตาม P-gp ดังกล่าวอาจจะไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติที่มีการทดสอบโดยใช้ rhodamine dye retention และ efflux assay^{23,24} ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อที่จะแสดงให้เห็นว่า P-gp ในคนไข้กุ่มนี้สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ในคนไข้ MM แรกได้รับการวินิจฉัย ค่า RI เท่ากับ 2.0-7.07 การที่มี P-gp expression ในระดับสูง อาจเป็นตัวบ่งชี้ถึงโอกาสที่จะดื้อยาเพิ่มมากขึ้น หลังการรักษา การศึกษาแบบ prospective serial studies เป็นสิ่งจำเป็นที่จะช่วยตอบคำถามที่ว่า ระดับ P-gp expression มีส่วนสัมพันธ์กับการดื้อยาในกลุ่มของ vinca alkaloid, anthracycline, epipodophyllotoxin หรือไม่ การใช้ยาที่จะเอาชนะการดื้อยาควรต้องนำมาพิจารณาตั้งแต่ระยะแรกๆ ของโรค เนื่องจากเซลล์ที่ดื้อยาอาจจะเกิดขึ้นได้ตั้งแต่ในช่วงต้นๆ ของการดำเนินโรค ควรมีการศึกษา P-gp ในเซลล์ lymphocytes จากเลือดเพื่อยืนยันผลการศึกษาที่พบว่ามีการเพิ่มของ P-gp ในคนไข้ MM ที่ยังไม่ได้รับการรักษา⁶ การวิจัยทางคลินิกที่ใช้ยาที่รบกวน การทำงาน P-gp transport pump หรือหยุดยั้งการทำงานของ P-gp เช่น cyclosporin, verapamil, lovastatin และ cyclosporin analogue, PSC 833²⁵⁻²⁷ ควรทำตั้งแต่ระยะเริ่มแรกของโรค

ค่า RI ของ P-gp ในคนไข้ MGUS และ PCM เท่ากับ 2.0-5.67 และ 3.15-5.46 ตามลำดับ เราไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่าง MGUS, PCM จาก MM แรกวินิจฉัยได้โดยใช้ P-gp expression ด้วยวิธีที่กล่าวแล้วข้างต้น ผลการวิจัยครั้งนี้อาจแตกต่างจากการศึกษาอื่นที่ใช้เทคนิคของ immunohistochemical ซึ่งพบว่าระดับของ P-gp จะสูงในคนไข้ MGUS มากกว่าคนไข้ MM ที่ยังไม่ได้รับการรักษา⁶

การวิจัยชิ้นนี้แสดงให้เห็นว่ามีการปรากฏของ MDR-1 บน plasma cells ในคนไข้ทุกกลุ่มที่มี monoclonal gammopathies และมีความแตกต่างของระดับ MDR-

1 เพียงเล็กน้อยในคนไข้ MGUS, PCM, MM และ amyloidosis อย่างไรก็ดีตามคนไข้ MM ที่ดื้อต่อยาเคมีบำบัด 2/5 รายมีระดับ P-gp สูงกว่าคนไข้ MM ที่อยู่ในระยะ plateau phase ข้อมูลดังกล่าวควรได้รับการยืนยันโดยใช้ serial studies กับ fresh cells ในสถาบันอื่นอีกทั้งควรทำ functional assays ควบคู่ไปด้วย

โดยสรุปคนไข้ MGUS, PCM, ทุกระยะของ MM และ amyloidosis เกือบทุกรายมีระดับของ P-gp สูงขึ้นภายใต้ภาวะทดลองดังที่กล่าวข้างต้น ซึ่งอาจเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า malignant plasma cells มีการดื้อยาที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันตั้งแต่ก่อนการรักษา และอาจเป็นเหตุผลหนึ่งที่จะอธิบายว่าทำไมเราไม่สามารถทำให้คนไข้เข้าสู่ complete remission ได้ด้วยยาเคมีบำบัดที่เราใช้กันอยู่ในช่วง induction

เอกสารอ้างอิง

1. Tiirikainen IM, Syrjala TM, Jansson ES, Krusius T. Flow cytometric analysis of P-glycoprotein in normal and leukemic cells. *Ann Hematol* 1992;65:124-30.
2. Efferth T, Mattern J, Volm M. Immunohistochemical detection of P-glycoprotein, glutathione S-transferase and topoisomerase II in human tumors. *Oncology* 1992;49:368-75.
3. Ling V. P-glycoprotein and resistance to anticancer drugs. *Cancer* 1992;69:2603-9.
4. Pastan I, Gottesman M. Multi-drug resistance in human cancer. *N Eng J Med* 1987;316:1388-93.
5. Grogan TM, Spier CM, Salmon SE, et al. P-glycoprotein expression in human plasma cell myeloma: Correlation with prior chemotherapy. *Blood* 1993;81:490-5.
6. Pilarski LM, Belch AR. Circulating monoclonal B cells expressing P-glycoprotein may be a reservoir of multidrug resistant disease in multiple myeloma. *Blood* 1994;83:724-36.
7. Epstein J, Xiao H, Oba BK. P-glycoprotein expression in plasma cell myeloma is associated with resistance

- to VAD. *Blood* 1989;74:913-7.
8. Sonneveld P, Durie BG, Lokhorst HM, Frutiger Y, Vela EE. Analysis of multidrug resistance (MDR-1) glycoprotein and CD56 expression to separate monoclonal gammopathy from multiple myeloma. *Br J Haematol* 1993;83:63-7.
 9. Alexanian R, Dimopolous M. The treatment of multiple myeloma. *N Eng J Med* 1994;330:484-9.
 10. Salmon SE, Crowley J. Impact of glucocorticoids and interferon on outcome in multiple myeloma. *Proc Am Soc Clin Onco* 1992;11:316a.
 11. Kyle RA, Greipp PR, Gertz MA. Treatment of refractory multiple myeloma and considerations for future therapy. *Semin Onco* 1986;13:326-33.
 12. Buzaid AC, Durie BGM. Management of refractory myeloma: a review. *J Clin Onco* 1988;6:889-905.
 13. Bergsagel DE. Treatment of plasma cell myeloma. *Ann Rev Med* 1979;30:431-3.
 14. Palmer M, Belch A, Hanson J, Brox L. Reassessment of the relationship between M-protein decrement and survival in multiple myeloma. *Br J Cancer* 1989;59:110-2.
 15. Belch A, Shelley W, Bergsagel D, Wilson D, Dlimo P, Willan A. A randomized trial of maintenance versus no maintenance melphalan and prednisone in responding myeloma patients. *Br J Cancer* 1988;57:94-9.
 16. Greipp PR. Advances in the diagnosis and management of myeloma. *Semin Hematol* 1992;29:24-45.
 17. Mechetner EB, Roninson IB. Efficient inhibition of P-glycoprotein mediated multidrug resistance with monoclonal antibody. *Proc Nat Acad Sci USA* 1992;89:5824-8.
 18. Schinkel AH, Arceci RJ, Smit J JM, et al. Binding properties of monoclonal antibodies recognizing external epitopes of human MDR-1 P-glycoprotein. *Cancer* 1993;55:478-84.
 19. Cumber MP, Jacobs A, Hoy T, Fisher J, Whittaker AJ, Tsuruo T. Expression of the multidrug resistance gene (MDR1) and epitope masking in chronic lymphatic leukemia. *Br J Haematol* 1990;76:226-30.
 20. Cumber MP, Jacobs A, Hoy T, Whittaker AJ, Tsuruo T, Padua AR. Increased drug accumulation ex vivo with cyclosporin in chronic lymphatic leukemia and its relationship to epitope masking of P-glycoprotein. *Leukemia* 1991;5:1050-3.
 21. Xie XY, Robb D, Chow S, Hedley DW. Discordant P-glycoprotein antigen expression and transport function in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1995;9:1882-7.
 22. Mongkonsritragoon W, Kimlinger T, Ahmann G, Greipp PR. Unmasking of P-glycoprotein by a commercial lysing solution. *Cytometry* 1997 (submitted).
 23. George E, Tsuruo T, Ling V. Topology of P-glycoprotein as determined by epitope mapping of MRK16 monoclonal antibody. *J Bio Chem* 1993;268:1792-8.
 24. Sugawara I, Kodo H, Ohkochi E, Hamada H, Tsuruo T, Mori S. High level expression of MRK16 and MRK20 murine monoclonal antibody defined proteins (170,000-180,000 p-glycoprotein and 85,000 protein) in leukemias and malignant lymphomas. *Br J Cancer* 1989;60:538-41.
 25. Dalton W, Greipp P, Greenberg P, et al. Phase I study of the chemosensitizer SDZ 833 in reverse multidrug resistance. *Blood* 1996;88(Suppl 1):662a.
 26. Sonneveld P, Schoester M, de Leeuw K. Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma: effect of cyclosporine on resistant tumor cells. *J Clin Onco* 1994;12:1584-91.
 27. Bates SE, Regis JJ, Robey RW, Zhan Z, Scala S, Meadows BJ. Chemoresistance in the clinic: overview. *Bulletin du Cancer* 1994;81:55s-61s.

Is Multidrug Resistance (P-Glycoprotein) an Intrinsic Characteristic of Plasma Cells in Patients with Plasma Cell Dysclasia?

Wichean Mongkonsritragoon, Terry Kimlinger*, Greg Ahmann and Philip R Greipp

Division of Hematology, Department of medicine, Pramongkutklao Hospital, *Department of Laboratory Medicine, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota

Abstract : Multiple myeloma is not a curable disease, and most patients relapse after plateau phase. Drug resistance is a major problem in effective chemotherapy in this kind of disease. Current approaches are aimed at reversing or preventing drug resistance late in the disease. We studied a drug resistance marker, P-glycoprotein (P-gp), in a total of 43 patients with monoclonal gammopathy. This group included eight with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), five with plasmacytoma (PCM), nineteen with multiple myeloma (MM; six newly diagnosed, seven plateau, five refractory, one relapse) and eleven amyloidosis (seven newly diagnosed, four after treatment). Using 3-color flow cytometry, a plasma cell gate was selected on the basis of CD38+/45-(dim) staining and the population was examined for the expression of P-gp using two monoclonal antibodies (MRK16 and UIC2). P-gp expression was positive on marrow plasma cells in 42/43 patients. The resistance index (RI) in these cases (range 2.0-7.07) is comparable to that in the positive cell line KG-1A (3.05-3.08). These data suggest that relative resistance due to the P-gp mechanism is likely to be an intrinsic property of plasma cells in monoclonal gammopathies and may provide a partial explanation as to why these diseases always relapse. Strategies for MDR reversal need to be considered earlier in the course.

Key Words : ● P-glycoprotein ● Multidrug resistance (MDR) ● Monoclonal gammopathy
● Multiple myeloma ● Amyloidosis

Thai J Hematol Transf Med 1999;9:29-38.